

若野洋一歯科臨床医学奨励賞受賞講演

転写因子 NF- κ B 活性の抑制による口腔扁平上皮癌の放射線感受性の増強

茂木 勝美

キーワード：口腔扁平上皮癌，放射線，NF- κ B，アポトーシス

Enhancement of Radiosensitization in Human Oral Squamous Carcinoma Cells via Suppressing the NF- κ B

Katsumi MOTEGI

Abstract : The nuclear factor κ B (NF- κ B) plays an important role in the development and progression of cancers. We had already reported that NF- κ B activity in head and neck carcinoma cells was significantly higher than that in normal oral epithelial cells due to the enhanced phosphorylation and degradation of I κ B α protein. We examined the mechanisms underlying the enhancement of radiosensitivity to γ -irradiation (IR) in human oral carcinoma cells (B88) in which NF- κ B activity was constitutively suppressed. Super-repressor form of I κ B α cDNA-transfected cell clone (B88mI) and empty vector-transfected cell clone (B88neo) was established. We found that the tumor forming ability in nude mice of B88mI clones was significantly lower than that of B88 or B88neo. This suppressed ability in tumorigenicity was attributed to the down regulation of the expression of interleukin (IL)-1 α , IL-6, IL-8 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in B88mI cell clones as compared to that in B88 or B88neo. IR induced a much greater degree of apoptosis, as evidenced by flow cytometry analysis and annexin V staining, in B88mI cell clone than B88 or B88neo. When tumor-bearing nude mice were treated with IR, the suppression of tumor growth was significantly augmented in B88mI cell clones as compared to that in B88 or B88neo. These findings indicate that inhibition of NF- κ B activity by introducing a super-repressor form of I κ B α cDNA into oral cancer cells led to a drastic decrease in tumorigenicity in nude mice and an acquisition of enhanced radiosensitization. Therefore, targeting NF- κ B may be a potential approach to controlling the growth of human cancers.

1. はじめに

頭頸部癌の治療法としては手術療法，放射線療法，化学療法が挙げられる。このうち放射線療法は癌の局所制御能力が高く，また臓器・機能温存性を有するため頭頸部癌の治療においては非常に有用な治療法であると考えられている。臨床において，外科的切除や放射線療法は stage I, II の初期の口腔癌では良好な治療成績を得ることができるが，これらの治療法は stage III, IV といった進

行例においては根治的な治療法にはなりえていないのが現実である¹⁾。

ヒト頭頸部癌細胞をはじめ種々の癌細胞においては，正常細胞と比較して転写因子 nuclear factor- κ B (NF- κ B) が高発現していることが明らかにされている^{2,4)}。NF- κ B は生体内の免疫活性や炎症反応，細胞の生存やアポトーシスに関する遺伝子の活性化において重要な役割を果たしており^{3,5)}，また最近の研究から NF- κ B は細胞

のアポトーシスを抑制する作用のあることが明らかになってきている⁶⁾。アポトーシス抑制因子のうち TNF receptor-associated factor (TRAF)-1, TRAF-2, cellular inhibitor of apoptosis protein (cIAP)-1, cIAP-2, cellular Fas-associated death domain-like interleukin 1 converting enzyme-inhibitory protein (cFLIP) は、遺伝子プロモーター領域に NF- κ B の結合領域があり、NF- κ B がこれら因子を活性化させることによりカスパーゼなどのアポトーシス促進因子を抑制し、細胞のアポトーシスを抑制することが報告されている^{6,7)}。癌細胞が放射線照射に対して抵抗性を獲得する詳細なメカニズムは未だ解明されていないが、放射線照射により誘導される NF- κ B の活性化が関与している可能性が推察されていることから、NF- κ B 活性を抑制することにより放射線によるアポトーシスを増強し、stage III, IV の進行癌を制御しうる可能性が考えられる。

ここでは、NF- κ B を分子標的とした頭頸部癌の治療法の可能性につき述べるものとする。

2. NF- κ B の抑制による腫瘍増殖抑制効果

ほ乳類では、NF- κ B を構成するサブユニットは RelA (p65), p50, p52, c-Rel, RelB の 5 種類が存在し、サブユニット間でホモあるいはヘテロ 2 量体を形成している。NF- κ B は主として p65 と p50 の 2 つのサブユニットからなる 2 量体のタンパクであり、細胞質内においてはその抑制因子の 1 つである I κ B α タンパクと結合した状

態で不活性型として存在している。細胞外からの TNF- α などの外界刺激により Mitogen-activated protein kinase kinase (MEKK)-1 や NF- κ B inducing kinase (NIK) とその下流に存在する I κ B kinase (IKK- α , β , γ) が活性化されると、I κ B α の N 末から 32 番目と 36 番目のセリンがリン酸化を受ける。その後 I κ B α はユビキチン化を受け、26S プロテアソームにより分解される。一方、free となった NF- κ B は核内に移行し、DNA 上の κ B モチーフと結合し標的遺伝子の転写活性を促進する (図 1)⁸⁾。既にいくつかの癌腫、例えば多発性骨髄腫や非小細胞性肺癌においては細胞の NF- κ B 活性を抑制すると腫瘍増殖が抑制されることが報告されている⁹⁻¹¹⁾。

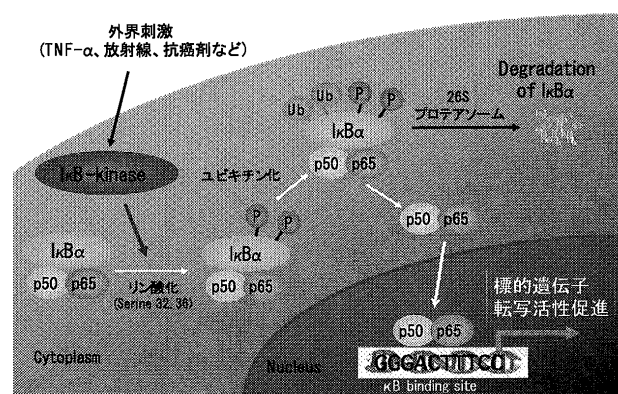


図1 NF- κ B 活性のシグナル伝達経路（標準的経路）

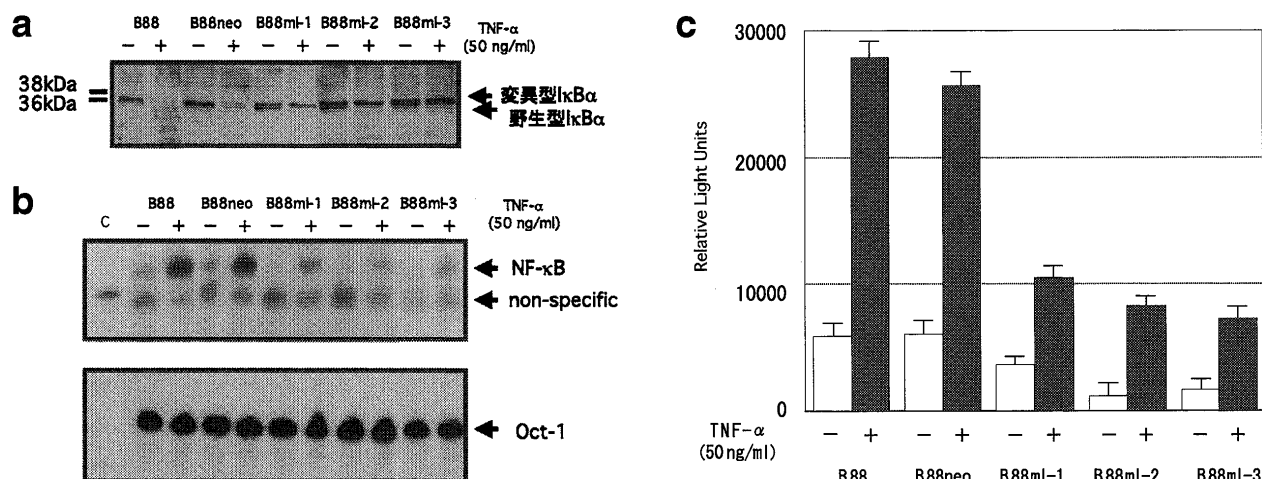


図2 B88細胞クローンにおける I κ B α タンパクの発現様式と NF- κ B の活性化

a. ウェスタンブロッティングによる I κ B α タンパクの検出 B88細胞および空ベクターをトランスフェクションした B88neo 細胞においては分子量 36 kDa の野生型 I κ B α タンパクの発現が確認された。B88ml 細胞クローンにおいては野生型 I κ B α タンパクに加え、38 kDa の変異型 I κ B α タンパクの発現が確認された。変異型 I κ B α タンパクは TNF- α (50 ng/ml) 処理によっても分解を受けず、安定的に発現していた。

b. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 法による NF- κ B 活性の検出 B88細胞および B88neo 細胞においては TNF- α (50 ng/ml) 処理により NF- κ B の活性化が認められたが、B88ml 細胞クローンにおいては NF- κ B の活性化は抑制されていた。(レーン上の C は competitor を示す)

c. ルシフェラーゼアッセイによる NF- κ B 転写活性の検出

我々はヒト口腔扁平上皮癌細胞 (B88細胞) における NF- κ B 活性を抑制するため、B88細胞に変異型 I κ B α 遺伝子 (srI κ B α) をトランスフェクションした細胞株 (B88mI-1, -2, -3) を作成した。変異型 I κ B α は N 末から32番目と36番目のセリンをアラニンに置換することで IKK によるリン酸化を受けず、NF- κ B を恒常的に抑制する¹²⁾。各細胞クローンにおける I κ B α タンパクの発現様式と NF- κ B 活性の関連性を図 2 に示す。B88mI 細胞においては、分子量 38 kDa の変異型 I κ B α タンパクが発現しており、これは TNF- α 処理によっても分解を受けず安定的に発現しており、また NF- κ B 活性も抑制することが確認された。

NF- κ B 活性を抑制した細胞株 (B88mI-1, -2, -3) と親株細胞 (B88細胞) ならびにエンブティーベクターのみをトランスフェクションした細胞株 (B88neo 細胞) の *in vitro* での細胞増殖能を検索したところ、これらの細胞間に細胞増殖の有意な差は認められなかった (図 3-a)。しかし、これら細胞クローンをヌードマウス背部皮下に移植し腫瘍を形成させ、腫瘍体積の経時的变化を検索したところ、変異型 I κ B α 遺伝子をトランスフェクションした細胞株においては有意な腫瘍増殖能の低下が認められた (図 3-b)。

このような *in vitro* と *in vivo* での細胞増殖能の違いが何に起因しているのか、ヌードマウス背部皮下に形成された腫瘍を組織学的に検索したところ、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色による腫瘍の組織像に明らかな違いは認められなかった。しかし、血管内皮細胞のマーカーである第Ⅷ因子関連因子を用いて腫瘍内の血管を染色したところ NF- κ B 活性を抑制した細胞株においては微小血管密度の減少が認められた (図 4 a, b)。多くの固形癌において腫瘍の増殖には栄養血管が必要であり、血管新

生の著明な腫瘍ほど増殖スピードが速いことから、腫瘍内の微小血管密度は種々の癌腫において重要な予後因子として評価されている¹³⁾。血管新生因子は血管内皮細胞自身が産生し微小血管の伸展に利用する場合や、腫瘍細胞自身が産生し周囲組織からの血管新生を誘導する場合がある¹³⁾。*in vivo* での腫瘍増殖能の低下が腫瘍内血管密度の低下に起因している可能性が示唆されたことから、次に B88細胞から産生される血管新生関連因子を検索した。

3. NF- κ B の抑制による腫瘍関連因子の抑制

血管新生に関与する因子としてこれまでに種々の因子が報告されているが、その発現に NF- κ B が関与しているものとして、Vascular endothelial growth factor (VEGF), Interleukin (IL)-1 α , IL-6, IL-8などが挙げられる^{4, 14-18)}。VEGF は血管内皮細胞に特異的に作用し、細胞増殖や血管透過性を亢進する因子である^{13, 17)}。IL-1 α , IL-6, IL-8 は炎症性サイトカインであり、これらサイトカインはマクロファージ等の炎症性細胞や血管内皮細胞、腫瘍細胞から分泌され、血管新生を亢進させるほか、癌の浸潤、転移に寄与していることが報告されている^{14, 15)}。我々は腫瘍細胞から産生されるこれら血管新生因子について *in vitro* での検索をおこなったところ、培養上清中の IL-1 α , IL-6, IL-8, VEGF の濃度は NF- κ B を抑制した細胞クローンにおいてのみ減弱していた (図 5)。*in vitro* の培養細胞では、これら血管新生因子は細胞増殖に影響を与えることはなかったが、*in vivo* においては、これらの因子が腫瘍周囲の微小血管に作用し、腫瘍内の血管新生を誘導したものと考えられる。以上の所見よりヌードマウス背部皮下に形成された B88mI 腫瘍の増殖能の低下は、腫瘍細胞からの血管新生因子の産生低下によって腫瘍内の

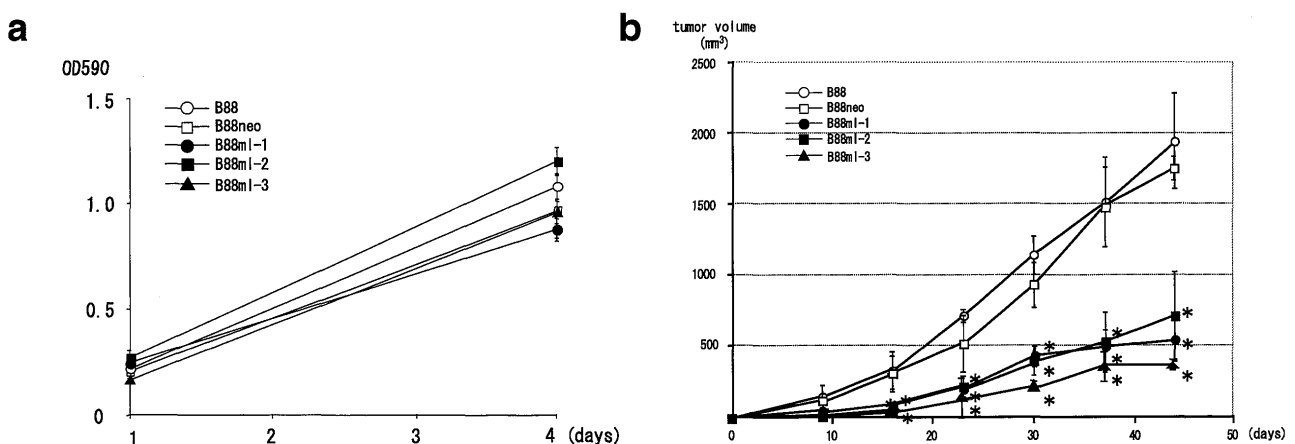


図 3 NF- κ B 活性の抑制による細胞増殖および腫瘍増殖に及ぼす影響

a. *in vitro* における各細胞クローンの細胞増殖に及ぼす影響 (MTT assay による)

b. *in vivo* における腫瘍増殖能の検索 1×10^5 個の各細胞クローンをヌードマウス背部皮下に移植後、経時的に腫瘍体積を測定した。

(* $p < 0.05$; B88 および B88neo との比較, Kruskal-Wallis test)

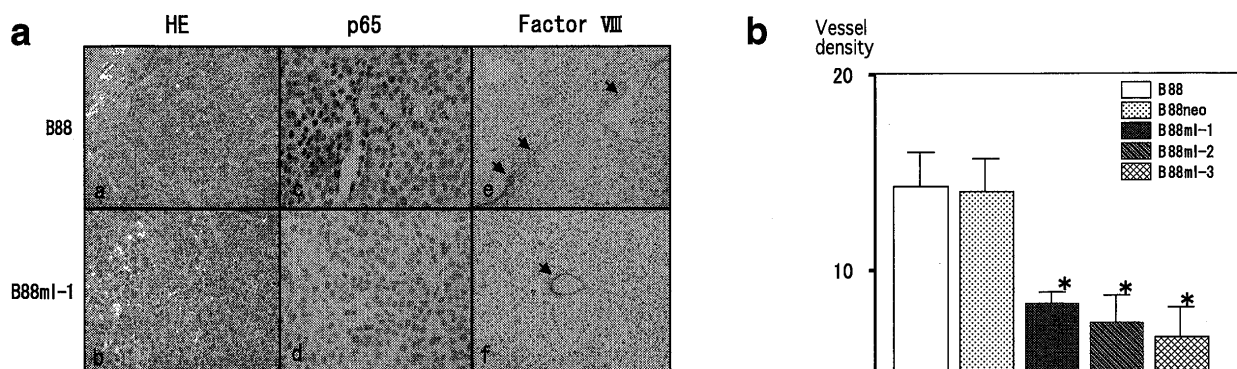


図4 ヌードマウス背部皮下に形成された腫瘍の組織像
a, b. HE 染色像, c, d. 免疫組織化学的染色 (抗 p65抗体), e, f. 免疫組織化学的染色 (抗 Factor VIII 抗体) (矢印は腫瘍内の血管を示す)
b. 腫瘍内血管密度
(* $p < 0.05$; B88 および B88neo との比較, Kruskal-Wallis test)

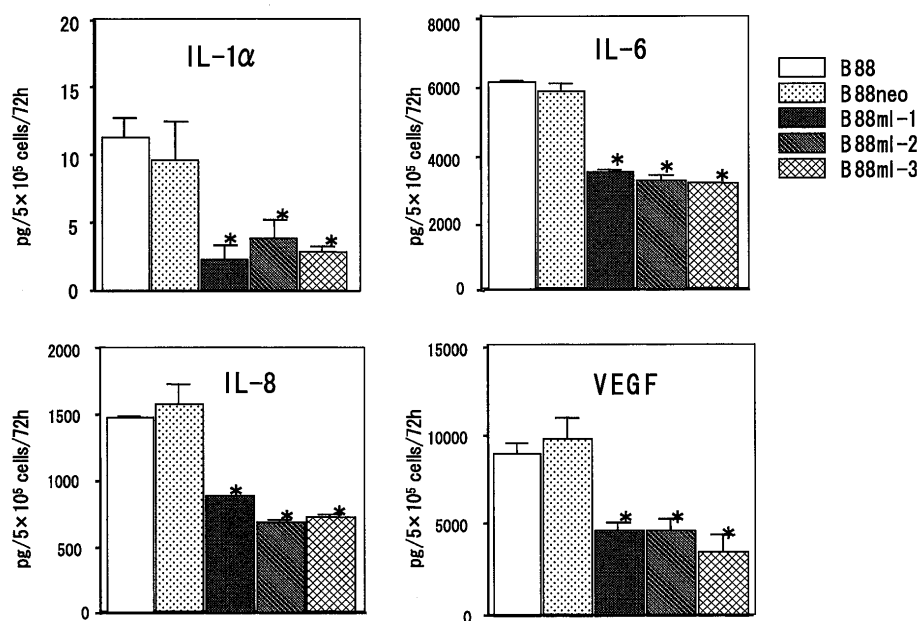


図5 各細胞クローンにおける血管新生因子発現の検索 (ELISA 法による)
各細胞クローンを72時間培養後、培養上清を回収し、各血管新生因子の濃度を測定した。
(* $p < 0.05$; B88 および B88neo との比較, Kruskal-Wallis test)

血管新生が抑制されたことに起因している可能性が示唆された。

4. NF-κB の抑制による放射線感受性の増強

NF-κB を活性化させる外界刺激には種々のものがあり、放射線もその1つである。癌細胞では、放射線照射によって細胞死につながるシグナル伝達が生じると同時に NF-κB の活性化が誘導され、抗アポトーシスならびに癌の進展に関与する遺伝子のシグナルが伝達されるとの報告がある¹⁹⁾。従って NF-κB を抑制することにより

放射線によって誘導される細胞死を増強しうる可能性が考えられることから、我々は各細胞クローンにおける放射線の影響を検索した。各細胞クローンを 5~20 Gy の放射線にて処理し、*in vitro* における細胞増殖能を検索したところ、全ての細胞クローンにおいて細胞増殖は放射線の線量依存的に抑制された。さらに、NF-κB を抑制した B88ml 細胞クローンにおいては B88 細胞および B88neo 細胞と比較して有意に細胞増殖抑制効果が増強されていた (図 6-a)。なお、この際に生じた細胞増殖抑制がアポトーシスによるものであることは、フロー

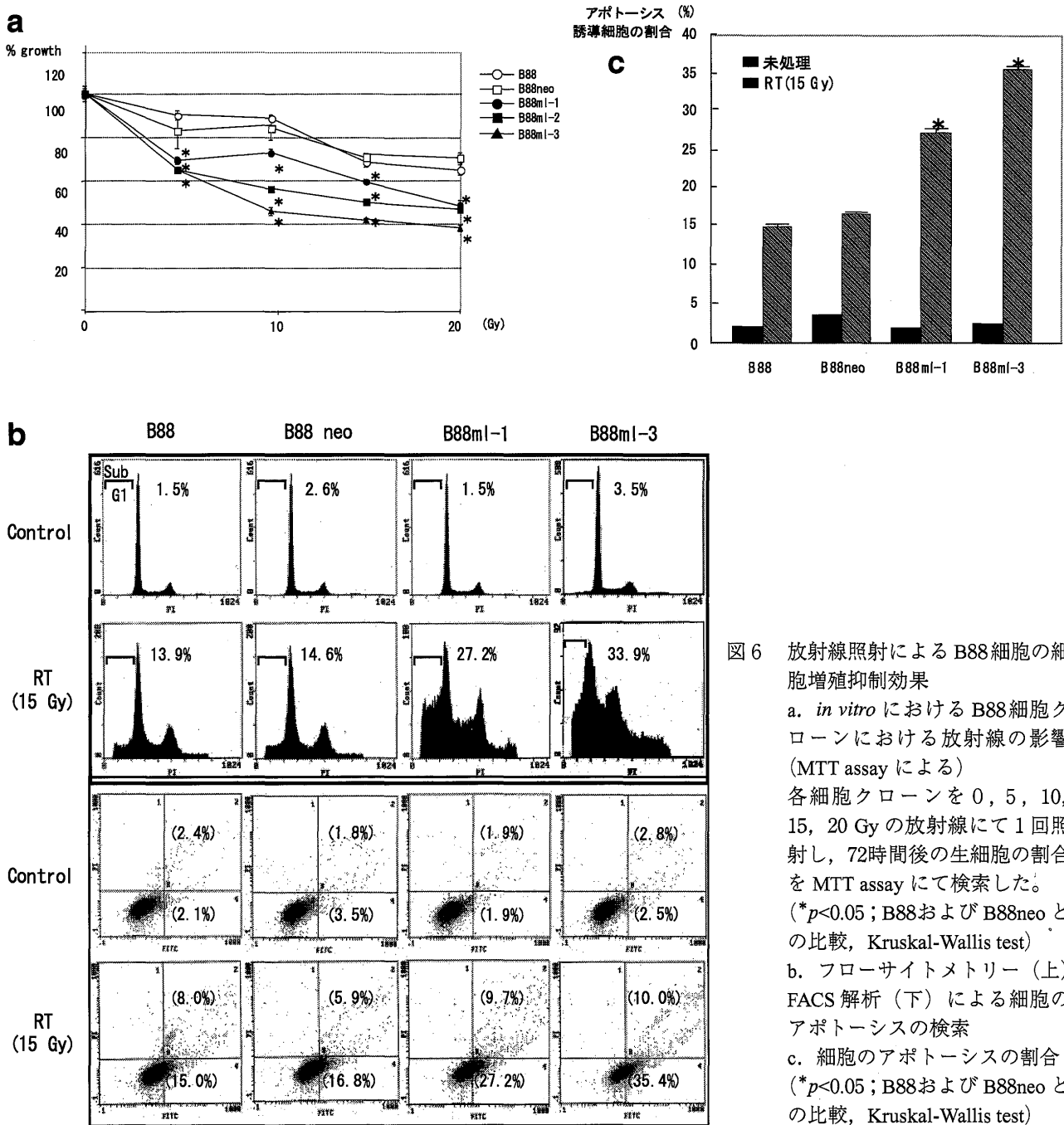


図6 放射線照射によるB88細胞の細胞増殖抑制効果

a. *in vitro* におけるB88細胞クローンにおける放射線の影響 (MTT assay による)

各細胞クローンを0, 5, 10, 15, 20 Gyの放射線にて1回照射し, 72時間後の生細胞の割合をMTT assayにて検索した。(* $p < 0.05$; B88およびB88neoとの比較, Kruskal-Wallis test)

b. フローサイトメトリー (上) FACS解析 (下) による細胞のアポトーシスの検索

c. 細胞のアポトーシスの割合 (* $p < 0.05$; B88およびB88neoとの比較, Kruskal-Wallis test)

サイトメトリーやFACS解析の結果より明らかであった (図6-b, c)。

次に*in vivo*における放射線の腫瘍増殖抑制効果を検索するため 1×10^5 個の各細胞クローンをヌードマウス背部皮下に移植後, 腫瘍体積が70~100 mm³に達したのち, 放射線を2 Gy/dayにて12日間照射し腫瘍体積の経時的な変化を測定した (図7)。B88腫瘍およびB88neo腫瘍においては, 放射線照射により腫瘍増殖は有意に抑制された。一方, B88ml腫瘍においては, 未処理の状況でも腫瘍増殖能は低下していたが, 放射線照射により腫瘍増殖は著明に抑制された。以上の検索結果より, ヒト口腔扁平上皮癌細胞のNF- κ B活性を抑制することによ

り, 放射線に対する感受性を増強しうる可能性が示唆された。

NF- κ Bのシグナルにより発現が誘導される抗アポトーシス因子にはTRAF-1, TRAF-2, cIAP-1, cIAP-2, cFLIPが挙げられる^{6,7)}。ヒト口腔扁平上皮癌において放射線照射によって実際にどの因子の発現が増強されるのか現在検討中であるが, NF- κ B活性を抑制した癌細胞においてはNF- κ Bによる細胞生存のシグナルが遮断されることにより, 放射線によって誘導される細胞死のシグナルが優位になり, アポトーシスの誘導が増強されたものと推測する。

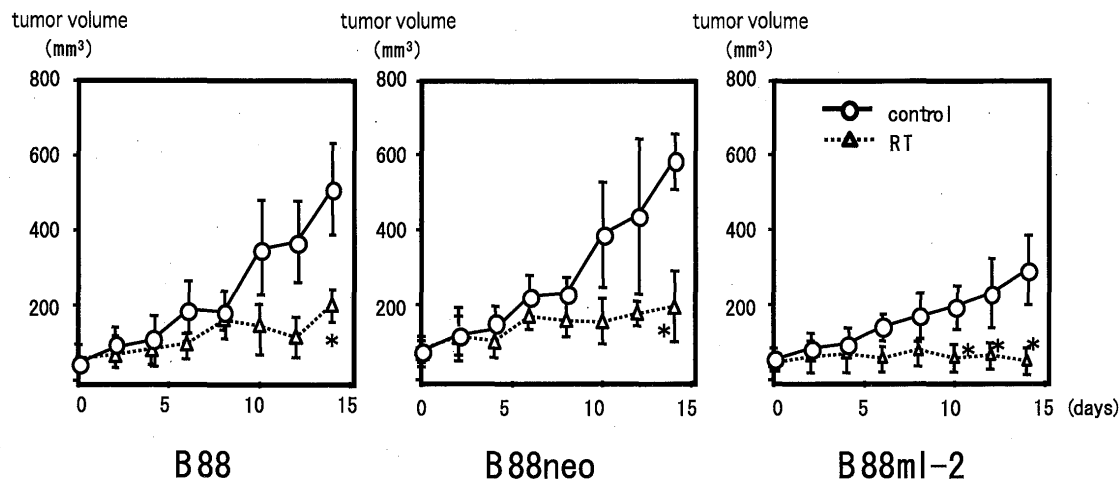


図7 NF- κ Bの抑制によるヌードマウス腫瘍の放射線感受性の増強

RTは放射線照射を示す。1×10⁵個の各細胞クローンをヌードマウス背部皮下に移植後、腫瘍体積が70~100 mm³に達したのち、放射線を2 Gy/dayにて12日間照射し腫瘍体積の変化を測定。

(* p <0.05; 放射線未処理との比較, Kruskal-Wallis test)

5. まとめ

このようにNF- κ B活性を抑制することにより、放射線照射による腫瘍増殖抑制効果が増強されたことから、放射線によって誘導されるNF- κ Bの制御が治療効果の向上につながるものと考えられる。現在国内外においてNF- κ B阻害剤やプロテアソーム阻害剤を用いた新規の治療法開発の研究がなされている²⁰⁻²²⁾。その中の1つであるボルテゾミブ(ベルケード®; ミレニアム社)はI κ B α を分解する26Sプロテアソームの阻害剤であり、I κ B α の分解を抑制することによってNF- κ B活性を抑制する作用を有している²⁰⁻²²⁾。現在欧米を中心に多剤耐性の多発性骨髄腫に対してボルテゾミブの臨床応用が始まっており、その治療効果が期待されている。我々もヒト口腔扁平上皮癌細胞を用いて、ボルテゾミブの抗腫瘍効果、放射線感受性の増強の有無、分子レベルでのアポトーシス誘導のメカニズムの解析をおこなっており、近い将来の頭頸部癌での臨床応用を期待するものである。

謝 辞

稿を終わるに臨み、本稿執筆の栄誉を賜りました四国歯学会会長坂東永一教授、編集委員長の吉本勝彦教授ならびに口腔腫瘍制御学分野佐藤光信教授に感謝の意を表します。なお、本研究の実施に際し御指導を戴きました口腔腫瘍制御学分野の東雅之講師、ならびに研究を実施するにあたり御協力を戴いた口腔腫瘍制御学分野玉谷哲也助手に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) Clark JR, Frei E 3rd. Chemotherapy for head and neck cancer: progress and controversy in the management of patients with M0 disease. *Semin Oncol* 16, 44-57 (1989)
- 2) Tamatani T, Azuma M, Aota K, Yamashita T, Bando T, Sato M. Enhanced I κ B kinase activity is responsible for the augmented activity of NF- κ B in human head and neck carcinoma cells. *Cancer Lett* 171, 165-172 (2001)
- 3) Duffey DC, Chen Z, Dong G, Ondrey FG, Wolf JS, Brown K, Siebenlist U, Van Waas C. Expression of a dominant-negative mutant inhibitor- κ B α of nuclear factor- κ B in human head and neck squamous cell carcinoma inhibits survival, proinflammatory cytokine expression, and tumor growth in vivo. *Cancer Res* 59, 3468-3474 (1999)
- 4) Huang S, Robinson JB, Deguzman A, Bucana CD, Fidler IJ. Blockade of nuclear factor- κ B signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8. *Cancer Res* 60, 5334-5339 (2000)
- 5) Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF- α -induced apoptosis by NF- κ B. *Science* 274, 787-789 (1996)
- 6) Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. NF- κ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281, 1680-1683 (1998)
- 7) Ferreira CG, Epping M, Krzyt FA, Giaccone G. Apoptosis: target of cancer therapy. *Clin Cancer Res* 8, 2024-2034 (2002)
- 8) Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin AS Jr. Role of transcriptional activation of I κ B α in mediation of immunosuppression by glucocorticoids.

- Science 270, 283-286 (1995)
- 9) Wang CY, Cusack JC Jr, Liu R, Baldwin AS Jr. Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF- κ B. *Nat Med* 5, 412-417 (1999)
- 10) Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, Mitsiades C, Mitsiades N, Hayashi T, Munshi N, Dang L, Castro A, Palombella V, Adams J, Anderson KC. NF- κ B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J Biol Chem* 277, 16639-16647 (2002)
- 11) Denlinger CE, Rundall BK, Jones DR. Modulation of antiapoptotic cell signaling pathways in non-small cell lung cancer: the role of NF- κ B. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 16, 28-39 (2004)
- 12) Traenckner EB, Pahl HL, Henkel T, Schmidt KN, Wilk S, Baeuerle PA. Phosphorylation of human I κ B- α on serines 32 and 36 controls I κ B- α proteolysis and NF- κ B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J* 14, 2876-2883 (1995)
- 13) Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1, 27-31 (1995)
- 14) Smith CW, Chen Z, Dong G, Loukinova E, Pegram MY, Nicholas-Figueroa L, Van Waes C. The host environment promotes the development of primary and metastatic squamous cell carcinomas that constitutively express proinflammatory cytokines IL-1 α , IL-6, GM-CSF, and KC. *Clin Exp Metastasis* 16, 655-664 (1998)
- 15) Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, Elner SG, Strieter RM. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 258, 1798-1801 (1992)
- 16) Gang Dong, Zhong Chen, Taiji Kato, and Carter Van Waes. The Host Environment Promotes the Constitutive Activation of Nuclear Factor-B and Proinflammatory Cytokine Expression during Metastatic Tumor Progression of Murine Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res* 59: 3495-3504 (1999)
- 17) Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res* 55, 15-35 (2000)
- 18) Fujimoto J, Sakaguchi H, Hirose R, Wen H, Tamaya T. Angiogenesis in endometriosis and angiogenic factors. *Gynecol Obstet Invest* 48, 14-20 (1999)
- 19) Cataldi A, Rapino M, Centurione L, Sabatini N, Grifone G, Garaci F, Rana R. NF- κ B activation plays an antiapoptotic role in human leukemic K562 cells exposed to ionizing radiation. *J Cell Biochem* 89, 956-963 (2003)
- 20) Voorhees PM, Dees EC, O'Neil B, Orlowski RZ. The proteasome as a target for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 9, 6316-6325 (2003)
- 21) Tan C, Waldmann TA. Proteasome inhibitor PS-341, a potential therapeutic agent for adult T-cell leukemia. *Cancer Res* 62, 1083-1086 (2002)
- 22) LeBlanc R, Catley LP, Hideshima T, Lentzsch S, Mitsiades CS, Mitsiades N, Neuberg D, Goloubeva O, Pien CS, Adams J, Gupta D, Richardson PG, Munshi NC, Anderson KC. Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth in vivo and prolongs survival in a murine model. *Cancer Res* 62, 4996-5000 (2002)